

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19915

研究課題名(和文)エクソソームのmiRNA運搬能を応用した膵癌に対する腫瘍特異的新規治療の確立

研究課題名(英文) Exosomal microRNA transfer regulates cell proliferation and tumor progression in pancreatic cancer

研究代表者

野島 広之 (NOJIMA, HIROYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10507320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームの代表的なマーカーであるCD63抗体によるウェスタンブロットを行うと、BxPC-3、CFPAC-1、Panc-1の膵癌細胞株では発現を認めたのに対し、MIA PaCa-2、AsPC-1の膵癌細胞株では発現が減弱していた。以上の結果により、膵癌細胞株では、各細胞株によってエクソソームの分泌が異なることが示唆された。また、膵癌患者血清、膵癌細胞株からエクソソーム由来のRNAを同定した。各々のサンプルRNAからのPCRでのmiRNAの同定では、特定のmiRNAは認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated exosomes isolated from pancreatic cancer-derived cells. CD 63 was highly expressed in BxPC-3, CFPAC-1, Panc-1 cells, on the other hand CD 63 was slightly expressed in MIA PaCa-2, AsPC-1 cells. These results suggest that exosome production is depended on pancreatic cancer-derived cell. Furthermore, we detected exosomal RNA from pancreatic cancer-derived cells as well as serum from pancreatic cancer patients. We could not detect specific miRNA from various exosomal RNA.

研究分野：肝胆膵

キーワード：エクソソーム 膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は、手術および術後化学療法の集学的治療で治療成績は徐々に向上しているものの、術後早期再発が多く、組織学的治癒切除ができて、遠隔転移、局所再発が多いことから、他の癌と比較するといまだ予後不良である (Egawa et al. Pancreas 2012)。Micro RNA (miRNA)は、ゲノム上の非コード領域から転写される 20~25 塩基ほどの non-coding RNA で mRNA から蛋白質への翻訳阻害や mRNA の転写、安定性を担う機能を持っており (Bartel. Cell 2004) 細胞増殖、分化、細胞死などの役割をもつとともに、癌においてもその発現異常が、癌の発生・進行・転移に寄与することが報告されている。膵癌では、癌抑制遺伝子を抑制する miR-21 等の miRNA が膵癌組織で過剰発現しており、他方は、癌遺伝子を抑制する働きをもつ Let-7、miR-34a 等の miRNA 発現低下が報告され、miRNA による膵癌細胞の悪性度、治療抵抗性、さらに癌幹細胞性への関与が示唆されている (Szafranska et al. Oncogene 2007)。近年、この miRNA がエクソソーム内に含まれ、細胞外に分泌されることが明らかになるとともに、新たな細胞間シグナル伝達メカニズムとして注目されており (Valadi et al. Nat Cell Biol 2007) 申請者は、エクソソームが経時的に標的肝細胞に取り込まれる様子を示した (Nojima et al. J Hepatology 2015)。エクソソームは、蛋白質や miRNA を含有する直径 30nm~100nm のリン脂質二重層で構成される小胞であり、がん細胞を含め、さまざまな細胞から分泌されており、細胞外である血液、尿、唾液等に存在している (Nojima et al. J Hepatology 2015)。がんにおけるエクソソーム miRNA の役割として、新たなバイオマーカーとして、血液中エクソソーム miRNA による早期診断、予後との関連 (Tanaka et al. Cancer 2013) や、miRNA デリバリーツールとして、エクソソームを介した癌細胞増殖抑制効果、腫瘍増大抑

制効果が報告されている。このエクソソームを用いた miRNA 治療の要点は、

エクソソーム中の miRNA は、脂質二重層で構成される小胞内に存在するより、血液中においても安定しており、Rnase により分解されにくいこと (Quiyu et al. Molecules 2014, Valadi et al. Nat Cell Biol 2007)

経静脈投与により標的癌細胞にエクソソームが取り込まれることにより、MiRNA 発現を増加し、抗腫瘍効果を認めること (Ohno et al. Mol Ther 2013)

生来 miRNA を含有しているエクソソームを介した miRNA 治療は、すでに生体内にあるものを担体として用いること、各癌において、すでに行われているエクソソーム投与の臨床試験において大きな毒性を認めないこと (Dai et al. Mol Ther 2008)

から、他のデリバリーツールとして報告されているアテロコラーゲンを担体とした miRNA 治療と比較して (Takeshita et al. Mol Ther 2010) 安全性に優れていること

以上の特徴より、今後、膵癌での臨床応用が期待される miRNA を腫瘍に送達する核酸医薬治療は、生体由来の miRNA デリバリーシステムとして、エクソソームの腫瘍への miRNA の高い運搬能を応用することで、膵癌に対する腫瘍特異的治療としての確立が期待できる。

## 2. 研究の目的

膵癌では、microRNA (miRNA)の発現異常が、癌の発生・進行・転移に寄与することが報告されているが、miRNA を腫瘍選択的に送達する核酸医薬治療はまだ確立されていない。この miRNA を含有する、細胞から分泌された直径 30~100nm の小胞であるエクソソームは、癌での新たな細胞間シグナル伝達メカニ

ズムとして注目されている。そこで、本研究では膵癌でのエクソソーム中 miRNA を分離、解析し、膵癌細胞増殖、進展を制御している miRNA を含んだエクソソーム投与による標的となる癌細胞の増殖・浸潤抑制効果を明らかにし、さらに、膵癌の腫瘍特異的抗体で標識したエクソソームを用いることによる腫瘍選択性の増強を調べる。生体由来のデリバリーシステムとして、エクソソームの miRNA の高い運搬能を応用することで、膵癌に対する腫瘍特異的な新規核酸医薬治療としての確立を目指す。

### 3 . 研究の方法

本計画では、膵癌でのエクソソーム内の miRNA 発現異常を評価し、がん細胞増殖、進展を制御している miRNA を含有したエクソソームを膵癌に投与し、細胞増殖・浸潤能、腫瘍増大抑制効果を検討する。

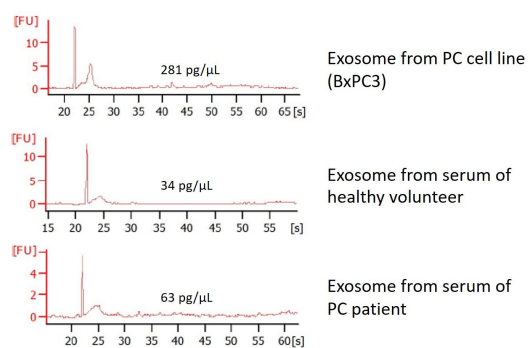
### 4 . 研究成果

膵癌でのエクソソームの存在を評価するために、まず各膵癌細胞株と正常膵上皮細胞株である HPDE 細胞を培養し、抽出した培養液から超遠心分離法にてエクソソームを分離した。エクソソームが分離できているかを、エクソソームの代表的なマーカーである CD63 抗体によるウェスタンブロットを行うと、BxPC-3、CFPAC-1、Panc-1 の膵癌細胞株では発現を認めただのに対し、MIA PaCa-2、AsPC-1 の膵癌細胞株では発現が減弱していた。正常細胞株においては CD63 抗体によるウェスタンブロットを行ったが、発現を認めなかった。膵癌手術を行った患者の血清でも同様に CD63 抗体によるウェスタンブロット



にて発現を確認した。

電子顕微鏡にてサイズを測定すると、膵癌細胞株である Panc-1 から抽出したエクソソームの平均値は 168.5nm、膵癌手術を行った患者の血清からは 180.2nm であった。Panc-1、健常者の血清、膵癌患者の血清からそれぞれ抽出したエクソソームから RNA を抽出し、バイオアナライザーにて解析すると、細胞由来のリボソーム RNA の発現を認めず、エクソソーム由来の RNA であることを確認した。以上の結果により、膵癌細胞株では、各細胞株によってエクソソームの分泌が異なることが示唆された。また、膵癌患者血清、健常者血清、膵癌細胞株からエクソソーム由来の RNA を同定した。



各々のサンプル RNA からの PCR での miRNA の同定では、特定の miRNA は認めなかった。

### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1 . Maeda S, Kuboki S, Nojima H, Shimizu H, Yoshitomi H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expressing in cancer cells inhibits tumor progression by suppressing CXCR2 signaling in human pancreatic ductal adenocarcinoma.

Cytokine 2017; 95: 12-21. (査読あり)

2. **Nojima H**, Konishi T, Freeman CM, Schuster RM, Japtok L, Kleuser B, Edwards MJ, Gulbins E, Lentsch AB Chemokine Receptors, CXCR1 and CXCR2, Differentially Regulate Exosome Release in Hepatocytes. PLoS One 2016; 11: e0161443. (査読あり)

[学会発表](計 3件)

1. 高橋誠 **野島 広之** 久保木 知 鈴木 崇之  
鈴木 謙介 西野 仁恵 米浦 直子 清水  
宏明 吉富 秀幸 古川 勝規 高屋敷 吏  
高野 重紹 鈴木 大亮 酒井 望 賀川  
真吾 宮崎 勝 大塚 将之

膵癌における術前 FDG-PET 検査による  
細胞増殖能評価, 予後予測での有用性

第 117 回 日本外科学会定期学術集会  
2017 年

2. **野島広之**、久保木知、高屋敷吏、吉富秀  
幸、古川勝規、高屋敷吏、高野重紹、  
鈴木大亮、酒井 望、賀川真吾、宮崎  
勝、大塚将之

80 歳以上の高齢者に対する膵頭十二指  
腸切除術における手術リスクの検討

第 117 回 日本外科学会定期学術集会  
2017 年

3. **Nojima H**, Kuboki S, Yoshitomi H, Furukawa  
K, Takayashiki T, Takano S, Suzuki D,  
Sakai N, Kagawa S, Miyazaki M, Ohtsuka  
M

Management and risk factors for  
postoperative pancreatic fistula grade C in

pancreaticoduodenectomy

Joint Congress of The 6th Biennial Congress  
of the Asian-Pacific  
Hepato-Pancreato-Biliary Association &  
The 29th Meeting of Japanese Society of  
Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery  
2017 年

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

野島 広之 (Hiroyuki Nojima)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10507320

(2)研究分担者

なし 研究者番号：

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高橋 誠 ( Makoto Takahashi )

仲田 真一郎 ( Shinichiro Nakata )